



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12P 7/64</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/12743</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月9日(09.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04392</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月12日(12.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/247355 1998年9月1日(01.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 関西化学機械製作株式会社 (KANSAI CHEMICAL ENGINEERING CO., LTD.)[JP/JP] 〒660-0053 兵庫県尼崎市南七松町2丁目9番7号 Hyogo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 島田裕司(SHIMADA, Yuji)[JP/JP] 〒546-0044 大阪府大阪市東住吉区北田辺4丁目6番13号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 渡辺 嘉(WATANABE, Yomi)[JP/JP] 〒536-0025 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目7番809号 Osaka, (JP)</p> <p>杉原耿雄(SUGIHARA, Akio)[JP/JP] 〒664-0898 兵庫県伊丹市千僧6丁目87番地 Hyogo, (JP)</p>		<p>富永嘉男(TOMINAGA, Yoshio)[JP/JP] 〒555-0021 大阪府大阪市西淀川区歌島2丁目7番2号 Osaka, (JP)</p> <p>福田秀樹(FUKUDA, Hideki)[JP/JP] 〒655-0871 兵庫県神戸市垂水区松風台1丁目8番13号 Hyogo, (JP)</p> <p>野田秀夫(NODA, Hideo)[JP/JP] 〒660-0053 兵庫県尼崎市南七松町2丁目9番7号 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 南條博道(NANJO, Hiromichi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番4号 大三ビル3階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (CH, DE, DK, FR, GB, IT, NL)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING LOWER ALCOHOL ESTER</p> <p>(54)発明の名称 低級アルコールエステルの製造方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A process for efficiently producing a fatty acid ester at a low cost in a system which is completely or almost completely free from any solvent. In the above process, a linear lower alcohol is reacted with lipase and a fat/oil while controlling the concentration of the linear lower alcohol to a level not exceeding the lipase inhibitory concentration of the linear lower alcohol, or a fatty acid ester is added to the reaction system and lipase and a fat/oil are reacted with a linear lower alcohol. By using a natural fat/oil (a vegetable fat/oil, an animal fat/oil, etc.) or a waste fat/oil thereof as the above-described fat/oil, the waste fat/oil to be discharged into the environment can be recycled and, at the same time, a bio-diesel fuel with little environmental pollution can be provided.</p>		

(57)要約

無溶媒ないし微溶媒系で、脂肪酸エステルを低コストで、かつ効率よく製造する方法を提供すること。

直鎖低級アルコールのリパーゼ阻害濃度以下の濃度に該直鎖低級アルコール濃度を調節しつつ、リパーゼと油脂と該直鎖低級アルコールとを反応させる、あるいは、反応系に、脂肪酸エステルを添加して、リパーゼと油脂と直鎖低級アルコールとの反応を行う方法が提供される。

油脂として、植物油脂、動物油脂などの天然油脂、これらの廃油を用いることにより、環境に廃棄される廃油のリサイクルが可能になると同時に、環境汚染の少ないバイオディーゼル燃料が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU コスタ・リカ
CY キューバ
CZ キプロス
DE チェッコ
DK ドイツ
DM デンマーク

DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国

KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア

RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シェラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィエトナム
YU ユーゴスラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明 細 書

低級アルコールエステルの製造方法

5 技術分野

発明は、無溶媒系または微溶媒系における脂肪酸の低級アルコールエステルの製造方法に関する。

背景技術

- 10 近年、石油燃料を始めとする化石燃料が、二酸化炭素、一酸化窒素あるいは二酸化窒素などの NO_x 、二酸化イオウなどの SO_x などを大量に排出し、地球温暖化の原因、環境汚染の原因となっている。これらの汚染源をいかに削減するかが、世界最大の緊急課題とされている。

- 15 その中でも、自動車、特にディーゼル自動車に用いられている軽油には、窒素化合物、イオウ化合物が含まれており、 CO_2 、 NO_x 、 SO_x が大量に発生する。そこで、この軽油に代わって、天然に存在する植物、動物、魚あるいは微生物が生産する油脂を用いる、いわゆるバイオディーゼル燃料の開発が進められている。

- 20 しかし、植物油、動物油などからバイオディーゼル燃料を得るためには、油脂をグリセリンとそれを構成する脂肪酸とに分離し、脂肪酸をエステル化する技術が要求される。

- 25 脂肪酸エステルを製造する方法には、化学的方法と生物学的方法とがある。化学的方法では、化学触媒を用いて行うが、反応後中和するプロセスが必須であり、中和槽を設けなければならないというプロセス上の問題、および比較的高温で反応を行わなければならないため、エネルギー多消費型であるという欠点がある。

他方で、生物学的方法においては、通常は、油脂にリパーゼを作用させ、常温で、脂肪酸エステルが得られるという利点がある。そこで、リパーゼを用いる脂肪酸エステルの製造研究が種々、行われている。しかし、現在行われている方法は、もっぱら、油脂を溶媒（例えばヘキサン等）に溶解し、アルコールの存在下、リパーゼと反応させる方法である。この方法では、溶媒から脂肪酸エステルを分離する必要があり、溶媒を回収する操作が必要となつて、プロセスが煩雑になる上、コストも上昇するという欠点に加え、爆発の危険性も含んでいる。そのため、無溶媒系での開発が検討されている。

無溶媒系における実験例としては、JAACS 73巻、1191～1195頁(1996)に、記載がある。この実験によれば、イソプロパノール、イソブタノール、2-ブタノールの分岐アルコールを用いた場合は、90%以上の脂肪酸エステルが得られているが、メタノール、エタノール等の工業的に用いられる安価なアルコール類では、脂肪酸エステル化反応がほとんど進行しないことが記載されている。このように、無溶媒系での安価なアルコールを用いる、非エネルギー消費型のバイオディーゼル（脂肪酸エステル）の生産方法は未だ確立されていないのが現状である。

そこで、メタノール、エタノールなどの安価なアルコールを用いて、無溶媒系ないし微溶媒系で、効率よく脂肪酸エステルを製造する技術が望まれている。

発明の開示

本発明は、上記問題点を解決するために行われたものであり、本発明により、メタノール、エタノールなどの安価なアルコールを用いて、無溶媒系ないし微溶媒系で、効率よく脂肪酸エステルが製造される。

本発明は、無ないし微溶媒系において、直鎖低級アルコールのリパーゼ阻害濃度以下の濃度に該直鎖低級アルコール濃度を調節しつつ、リパーゼと油

脂と該直鎖低級アルコールとを反応させる、脂肪酸エステル製造方法に関する。

好適な実施態様においては、前記直鎖低級アルコールが、メタノールまたはエタノールである。

- 5 また、好適な実施態様においては、前記油脂が、植物油脂、動物油脂、魚油、微生物によって生産される油脂、これらの混合油脂、あるいはこれらの廃油である。

- 10 本発明は、また、無ないし微溶媒系において、脂肪酸エステルを添加して、リパーゼと油脂と直鎖低級アルコールとの反応を行う、脂肪酸エステル製造方法に関する。

好適な実施態様においては、前記直鎖低級アルコールの濃度が、リパーゼ阻害濃度またはそれ以上の濃度である。

好適な実施態様においては、前記直鎖低級アルコールが、メタノールまたはエタノールである。

- 15 好適な実施態様においては、前記脂肪酸エステルが、反応開始時に反応液の10～80重量%存在する。

さらに好適な実施態様においては、前記反応が反応生成物のリサイクルにより行われ、供給液中に脂肪酸エステルが10～80重量%含まれている。

- 20 好適な実施態様においては、前記油脂が、植物油脂、動物油脂、魚油、微生物によって生産される油脂、これらの混合油脂、あるいはこれらの廃油である。

また、本発明は、無ないし微溶媒系における脂肪酸エステル製造方法であって、以下の工程：

- 25 (1) リパーゼ阻害濃度以下の直鎖低級アルコールと油脂とを反応させる工程：
おおよび

(2) (1) の反応終了液に、さらに直鎖低級アルコールを添加する工程：

を含む、方法に関する。

好適な実施態様においては、さらに、(2) の反応液の全部または1部を、
5 油脂とリパーゼの阻害濃度以上の直鎖低級アルコールの混合液に添加して、
連続的または逐次的に反応させる工程を含む。

発明を実施するための最良の形態

本発明の第1は、リパーゼを用いる油脂とアルコールとの間のエステル交
10 換反応において、直鎖低級アルコールがリパーゼを阻害ないし不可逆的に失
活させることを見出したことに基づいてなされたものである。すなわち、本
発明は、直鎖低級アルコール濃度を、リパーゼを阻害する濃度より低い濃度
に制御することにより、リパーゼの阻害ないし不可逆的失活を引き起こすこ
となく、エステル交換反応を効率よく進行させるものである。

15 エステル交換反応を最も効率よく行うためには、理論上、トリグリセリド
(以下、TGと略することがある) を基質とする場合、TG 1モル(mol)に
対して、直鎖低級アルコールを3モル(mol)加える必要がある。しかし、本
発明により、直鎖低級アルコールが、ある濃度以上になると、リパーゼを阻
害ないし失活することが見出された。例えば、メタノールをTGに対して1、
20 5モル当量以上加えるとリパーゼが不可逆的に失活してしまう。そこで、直
鎖低級アルコール濃度を、リパーゼを阻害ないし失活する濃度(以下、リパ
ーゼ阻害濃度という)より低い濃度に制御することにより、リパーゼの阻害
あるいは失活を引き起こすことなく、反応を進行させるのが、本発明である。

本発明において、無溶媒系または微溶媒系で、リパーゼ阻害濃度より低い
25 直鎖低級アルコール濃度でエステル交換反応を行なう方法は、どのような方
法でもよい。バッチ式でもよく、連続式でもよい。

バッチ式の場合、リパーゼ阻害濃度より低い直鎖低級アルコール濃度でエステル交換反応を行い、ついで、この反応終了液に、直鎖低級アルコールを、リパーゼ阻害濃度よりも低い濃度となるように加えて、さらにエステル交換反応を行う方法（多段形式）でもよい。直鎖低級アルコールの濃度により、2バッチ（2段反応）で反応を終了させることもできるし、3バッチ（3段）またはそれ以上で反応を終了させてもよい。

メタノールとリパーゼ（ノボザイム435）を例に挙げて具体的に説明すると、メタノールのリパーゼ阻害濃度は、油脂の約1.5モル(mol)当量以上であるので、例えば、まず、油脂の1mol当量のメタノールを添加して第1段の反応を終了（理論収量33%）させ、ついで、1mol当量のメタノールを添加して、第2段の反応を終了（理論収量67%）させ、さらに1mol当量のメタノールを添加して第3段の反応を行うことにより、油脂から、理論量の脂肪酸エステルを得ることができる。

後に説明するように、本発明者らにより、無溶媒系における油脂と直鎖低級アルコールのエステル交換反応において、直鎖低級アルコールによるリパーゼ阻害が脂肪酸エステルの存在により解除されることが見いだされた。これによれば、1バッチ目の反応終了液には脂肪酸エステルが含まれているので、2バッチ目以降、リパーゼは直鎖低級アルコールの阻害を受けにくくなる。従って、2バッチ目に添加する直鎖低級アルコール濃度は、1回目よりは高くすることができる。例えば、1バッチ目の終了後には、理論上33%の脂肪酸エステルが含まれるので、2バッチ目に1モル(mol)当量以上（例えば、2モル(mol)当量）のメタノールを添加して、エステル交換反応をすることもできる。このような形態も、本発明に含まれる。

また、バッチ式の場合、最も簡単には、固定化リパーゼと油脂の存在下、例えば、（例えば、コンピューターで）直鎖低級アルコールの濃度をリパーゼ阻害濃度以下に調節しながら、直鎖低級アルコールを逐次添加することに

より、脂肪酸エステルを得ることができる。この場合、直鎖低級アルコールの消費量あるいは脂肪酸エステルの生成量を考慮しつつ、直鎖低級アルコールの添加量を調節することもできる。

連続式の場合は、固定化リパーゼのカラムを2本またはそれ以上接続し、
5 2本目以降のカラムには、カラム溶出液に直鎖低級アルコールを混合しながら、フィードし、反応させてもよい。この場合、脂肪酸エステルの存在量を測定して、2本目以降のカラムに添加する直鎖低級アルコール量を増加することができるのは、バッチ式の場合と同じである。フィードする油脂と直鎖低級アルコールの量は、固定化リパーゼ相の滞留時間と反応速度とを考慮して決定すればよい。
10

本発明の第2は、上記の直鎖低級アルコールによるリパーゼのエステル交換活性の阻害ないし失活を解除し、効率よくエステル交換反応を行う手段を提供するものである。この第2の発明は、油脂と直鎖低級アルコールに脂肪酸エステルを添加して反応させると、直鎖低級アルコールの濃度がリパーゼ
15 を阻害する濃度またはそれ以上の濃度であっても、リパーゼの阻害を回避でき、無溶媒ないし微溶媒系での反応が極めてスムーズに進行し、ほぼ、100%の回収率で、脂肪酸低級アルコールエステルが得られるようになったという、本発明者らの知見に基づくものである。すなわち、本発明の第2は、脂肪酸エステルを添加して、リパーゼと油脂と直鎖低級アルコールとの反応
20 を行う点に特徴がある。

バッチ式においては、反応開始時に、予め、脂肪酸エステルを添加させておけばよい。次のバッチには、脂肪酸エステルを含む生成物の一部または全部を加えてもよい。

連続式の場合には、連続的にフィードする基質（油脂および直鎖低級アルコール）に、予め添加しておけばよい。効率的に行う手段として、例えば、
25 カラムを用いて反応を行う場合、カラムの流出液の一部を、油脂および直鎖

低級アルコール混合液に所定の脂肪酸エステル濃度となるように混合し、これを基質としてカラムにフィードすることにより、脂肪酸エステルの連続生産が可能となる。例えば、反応生成物がほぼ100%脂肪酸エステルである場合、70%を抜き出し、30%を戻すことにより、30%脂肪酸エステルを添加した基質が常時、カラムにフィードされる。

なお、添加する脂肪酸エステルは、油脂と直鎖低級アルコールとの反応により生じる脂肪酸エステルと同じでも良いし、異なってもよい。

添加する脂肪酸エステルは、反応開始時に、反応液の5～80重量%、好ましくは10～80重量%、より好ましくは、20～70重量%、最も好ましくは、30～50重量%となるように添加される。エステル交換反応により脂肪酸エステルが生成するので、添加する量は、阻害を解除できる範囲で、できるだけ少ない方がよい。

ここで、「脂肪酸エステルを添加して」というのは、反応開始の際、油脂及び直鎖低級アルコールの組成液中に所定量の脂肪酸エステルが含まれていることを意味し、連続式の場合には、フィードする油脂及び直鎖低級アルコールとの組成液中に所定量の脂肪酸エステルが含まれていることを意味する。

本願明細書において、無溶媒系とは、油脂を溶解するための溶媒を含まない意味であり、エステル化反応に用いられるアルコールは、本願明細書に言う溶媒ではない。

微溶媒系とは、油脂をエステル化反応に用いるアルコールに溶解させるために、補助的に溶媒が添加された系を意味する。油脂がアルコールに完全に溶解しない場合でも、反応は進行するため、必ずしも、溶媒を添加する必要もない。溶媒の添加により、反応が速まる可能性はある。

直鎖低級アルコールとは、炭素数1～8の直鎖アルコールをいう。特に、メタノール、エタノールが好適である。

リパーゼ阻害濃度とは、直鎖低級アルコールがリパーゼを阻害ないし失活

させ、エステル交換効率を低下させる濃度をいう。

本願明細書でリパーゼとは、グリセリドに作用して、グリセリンまたは部分グリセリドと脂肪酸に分解する能力を有する酵素をいう。リパーゼの起源は問わない。酵素の形状は問わず、粉末でもよいし、固定化されていてもよい。また、リパーゼを産生する微生物、その微生物を固定化した固定化微生物も含む。これらの中では、固定化されたリパーゼが、反応時における物質移動が速やかである、再使用ができる等の面から最も好ましい。

本発明に用いるリパーゼは、1,3-特異的であっても、非特異的であってもよい。脂肪酸の直鎖低級アルコールエステルの製造の面からは、非特異的である方が好ましい。リパーゼとしては、例えば、リゾムコール属 (*Rhizomucor miehei*)、ムコール属、アスペルギルス属、リゾプス属、ペニシリウム属等に属する糸状菌、キャンディダ属 (*Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*)、ピヒア (*Pichia*) 等に属する酵母、シュードモナス属、セラチア属等に属する細菌、豚膵臓等の動物に由来するリパーゼが挙げられる。市販のリパーゼも用いられる。例えば、*Rhizomucor miehei* のリパーゼ (リボザイムIM60: ノボノルディスク社製)、*Candida antarctica* のリパーゼ (ノボザイム435: ノボノルディスク社製)、*Rhizopus delemar* のリパーゼ (タリパーゼ: 田辺製薬社製)、*Candida cylindracea* (リパーゼOF: 名糖産業社製) および *Pseudomonas* 属のリパーゼ (リパーゼPS、リパーゼAK: 天野製薬社製) が挙げられる。

これらのリパーゼを担体に固定化する方法は公知である。担体としては、イオン交換樹脂、セラミックス担体、ガラスビーズ、活性炭等が挙げられる。耐久性、リパーゼとの親和性などを考慮すると、イオン交換樹脂、セラミックス担体等が最も好ましい。固定化方法としては、包括法、架橋法、物理的吸着法、イオン吸着法、疎水結合法等が挙げられるが、架橋法や疎水結合法が最も好ましい。

また、市販の固定化リパーゼ、例えば、ノボザイム435、リポザイムIM60（いずれもノボノルディスク社製）も本発明に好適に用いられる。

油脂としては、グリセリド、中でもトリグリセリドを多く含む油脂が好ましい。油脂としては、植物油脂、動物油脂、魚油、微生物が生産する油脂、
5 これらの混合油脂、あるいはこれらの廃油が好ましく用いられる。植物油脂としては、大豆油、菜種油、パーム油、オリーブ油等が挙げられる。動物油脂としては、牛脂、豚脂、鯨油、羊脂等が挙げられる。魚油としては、イワシ油、マグロ油、イカ油等が挙げられる。微生物が生産する油脂としては、モルティエラ属（*Mortierella*）やシゾキトリウム属（*Schizochytrium*）
10 等によって生産される油脂が挙げられる。

本願明細書において、廃油とは、使用済みの植物および動物油脂をいい、例えば、天ぷら廃油などを意味する。廃油は、高温にさらされているので、水素化され、酸化され、あるいは過酸化された油を含んでいるが、これらも原料となり得る。水分を含んでいてもよい。

15 油脂と直鎖低級アルコールとリパーゼとの間のエステル交換反応は、一般的には、5℃～80℃、好ましくは、15℃～50℃、より好ましくは、25℃～45℃で行われ、これらは、用いるリパーゼにより決定すればよく、例えば、耐熱性のリパーゼであれば、比較的高温で反応する。

反応時間は、油脂と直鎖低級アルコールの組成と酵素量で決定される。

20 反応終了後、生じた脂肪酸エステルは、静置、遠心分離、膜分離、分子蒸留、精密蒸留等の分離操作の常法によりグリセリンと未反応のグリセリドとから分離され、回収される。

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明が、これらの実施例に
25 限定されないことは言うまでもない。

なお、脂肪酸の低級アルコールエステルは、DB-5キャピラリーカラム

を用い、トリカプリリンを内部標準として、ガスクロマトグラフィー（GC）で定量した。また、ヘキサン／酢酸エチル／酢酸＝90／10／1の混合溶媒を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィー（TLC）で、定性分析を行なった。

5

（実施例1：メタノール添加量の影響）

大豆油（平均分子量884）とメタノール（分子量32）とを、モル比で1：0.3～1.0の割合で混合した混合物10gに、酵素（ノボザイム435）を0.4g加えて、30℃、130振盪／分で振盪しながら24時間反応し、150 μ lサンプリングして、生じた脂肪酸エステルをGCおよびTLCで分析した。結果を表1に示す。なお、変換率は、大豆油を構成している脂肪酸のメチルエステル化率で示した。

10

表1

15

反応液組成(g)			モル(mol)比	変換率(%)
大豆油	メタノール	ノボザイム	大豆油:メタノール	
9.89	0.11	0.4	1:0.33	32.1
9.79	0.21	0.4	1:0.67	67.8
9.65	0.35	0.4	1:1	98.1
9.48	0.52	0.4	1:1.5	100.0
9.32	0.68	0.4	1:2	33.1
9.02	0.98	0.4	1:3	11.8
8.22	1.78	0.4	1:6	3.8
7.34	2.66	0.4	1:10	---

20

25

この結果、油脂に対して1.5モル当量以上のメタノールは、エステル交換反応を阻害することがわかった。大豆油とメタノールをモル比で1：3で混合した場合、すなわち、エステル交換の理論上の等モルを混合した場合は、1／10程度の活性であった。この反応系から、酵素を回収し、この酵素に大豆油とメタノールをモル比で1：1で混合して反応させたが、活性の回復

は認められなかった。すなわち、リパーゼの失活は、不可逆的であった。

(実施例2：酵素量の影響)

酵素量の影響について検討した。大豆油とメタノールとを、リパーゼ活性
5 を阻害しないモル比1：1で混合した。すなわち、大豆油9.65gとメタ
ノール0.35gの混合物10gに、酵素（ノボザイム435）を1～10
重量%加えて、30℃、130振盪/分で振盪しながら反応させた。6時間
目と24時間目のサンプルについて、脂肪酸エステルを分析した。メタノ
ールのメチルエステルへの変換率を表2に示す。

表2

酵素量(%)	変換率(%)	
	6時間	24時間
1	41.9	86.5
2	84.7	92.2
4	82.5	98.5
7	97.0	101.0
10	90.8	98.0

15 酵素量は反応系に悪影響を与えなかった。添加する酵素量は、反応時間を
考慮して決定すればよい。以降の実験には、4重量%の酵素を用いた。

20 (実施例3：グリセリンの影響)

エステル交換反応により生じるグリセリンの、エステル交換反応に及ぼす
影響について検討した。大豆油とメタノールとグリセリン（分子量92）と
を、モル(mol)比1：1：1～3で含有する10gの混合物に、酵素（ノボ
ザイム435）を0.4g加えて、30℃、130振盪/分で振盪しながら
25 反応させた。24時間後、生じた脂肪酸エステルをGCおよびTLCで分析
した。メタノールのメチルエステルへの変換率を表3に示す。

表 3

大豆油	反応液組成(g)			大豆油:グリセリン	変換率(%)
	メタノール	グリセリン	ノボザイム		
8.77	0.32	0.91	0.4	1:1	91.5
8.04	0.29	1.67	0.4	1:2	92.8
7.42	0.27	2.31	0.4	1:3	90.7

グリセリンは反応系に悪影響を与えなかった。

10 (実施例 4 : 水分量の影響)

エステル交換反応に及ぼす水の影響について検討した。大豆油 9.65 g とメタノール 0.35 g の混合物 (モル(mol)比 1 : 1) 10 g (水分量 318 ppm) に、0~20,000ppmの水と酵素 (ノボザイム 435) を 0.4 g 加えて、30℃、130 振盪/分で振盪しながら反応させた。24 時間経過後、酵素を回収し、同じ組成の基質を添加して (すなわち、反応液を新しい基質と交換して)、2 サイクル目の反応を 24 時間行い、再度、反応液を新しい基質と交換して、3 サイクル目および 4 サイクル目の反応を行なった。

1 サイクル目と 4 サイクル目の反応の、6 時間目と 24 時間目のサンプルについて、脂肪酸エステルを分析した。また、反応系中の水分量をカールフィッシャー滴定法で測定した。結果を表 4 に示す。なお、表 4 中の変換率は、メタノールのメチルエステルへの変換率を示し、加水分解率は、反応系中に存在する全脂肪酸に対する遊離の脂肪酸の割合を示す。

表 4

水添加量 (ppm)	1サイクル				4サイクル			
	変換率(%)		水分量 (ppm)	加水分解率 (%)	変換率(%)		水分量 (ppm)	加水分解率 (%)
	6時間	24時間			6時間	24時間		
0	86.2	94.2	140	1.12	90.8	98.5	333	1.58
400	95.7	96.0	245	1.54	91.9	99.1	320	1.85
700	55.9	91.9	251	1.63	95.5	96.5	437	1.89
1000	47.7	95.2	271	1.79	94.6	99.6	467	2.32
2000	31.4	91.0	472	2.71	94.8	100.2	579	2.69
4000	24.3	88.7	847	3.69	62.4	98.3	911	3.11
7000	22.6	82.5	1516	4.27	49.9	98.8	2617	4.16
10000	20.0	68.5	2722	4.62	48.5	98.7	3350	3.16
20000	20.0	66.9	8160	5.71	44.4	93.5	19385	3.05

1 サイクル目には、高い水分量は変換率と加水分解率に悪影響を与えたが、サイクルが進むに従い、その影響はいくぶん少なくなった。基質中に0.2%程度の水分が混在していても、反応にほとんど影響しない。サイクルを重ねるごとに、水への耐性が高まるようであり、より高い水分濃度でも十分に耐えられると考えられる。さらに2%の水を含む反応系で反応した後、反応液を水を含まない基質と交換して反応を繰り返すと、阻害された活性の回復が認められた。油脂に水分が含まれていても、本発明の方法を用いれば、反応に悪影響を与えないと思われるため、本発明の方法は、水分を多く含む油脂にも適用できる。

(実施例5：脂肪酸エステルの影響－1)

エステル交換反応に及ぼす脂肪酸エステルの影響について検討した。大豆油とメタノールをモル(mol)比で1：3、およびオレイン酸メチルを10～70重量%含有する10gの混合物に、酵素(ノボザイム435)を0.4g加えて、30℃、130振盪/分で振盪しながら反応させた。6時間および24時間後サンプルについて脂肪酸エステルを分析した。結果を表5に示

す。変換率はoilのメチルエステルへの変換率で表わした。

表 5

5

反応物組成(g)			変換率(%)	
大豆油	メタノール	オレイン酸メチル	6時間	24時間
8.93	1.07	0.00 (0%)	3.6	11.8
8.04	0.96	1.00 (10%)	21.2	58.6
7.15	0.85	2.00 (20%)	30.6	98.0
6.25	0.75	3.00 (30%)	51.6	99.2
5.36	0.64	4.00 (40%)	40.5	97.3
4.67	0.53	5.00 (50%)	49.2	96.9
3.57	0.43	6.00 (60%)	45.5	99.3
2.68	0.32	7.00 (70%)	34.2	93.2

10

この結果は、メタノールがTGに対して、3モル当量以上含まれていても、エステル化反応が進行することを示した。すなわち、メタノールによるリパーゼ阻害が解除されていることがわかった。ただし、反応液中のメチルエステル（オレイン酸メチル）量が増加すると、エステル交換速度は低下する傾向にある。脂肪酸エステルを添加する場合は、適切な添加量を決定する方が好ましい。

15

（実施例6：脂肪酸エステルの影響-2）

20

大豆油とメタノールをモル(mol)比で1:3.3、およびオレイン酸メチルを20、30、40および50重量%それぞれ含有する10gの混合物に、酵素（ノボザイム435）を0.4g加えて、30℃、130振盪/分で振盪しながら24時間反応させた。この反応を1サイクルとし、反応液を新しい基質と交換して、2サイクル目の反応を行なった。これを繰り返して、50サイクルの反応を行なった。各サイクルの終了時に、150 μ lサンプリングして、生じた脂肪酸エステルをGCおよびTLCで分析した。なお、表6中の数字は基質として用いたoilのメチルエステルへの変換率を表し、

25

() 内は、加水分解率を示す。

表 6

サイクル数	メチルエステルの添加量(%)			
	20%	30%	40%	50%
1	56.8 (0.40%)	86.4 (0.57%)	81.4 (0.92%)	70.6 (0.76%)
5	108.0 (0.59%)	111.2 (0.67%)	103.7 (1.37%)	95.3 (0.91%)
10	95.3 (0.62%)	92.4 (0.82%)	98.5 (0.90%)	99.7 (0.97%)
20	92.1 (0.78%)	99.8 (0.82%)	97.3 (0.95%)	96.5 (0.99%)
50	88.2 (1.02%)	94.3 (1.23%)	91.0 (1.31%)	92.3 (1.50%)

()内は加水分解率を表わす。

10 この結果も、リパーゼ阻害濃度以上のアルコールの存在下でも、脂肪酸エステルが存在すれば、エステル交換反応が進行することを示している。そして、オレイン酸メチルの場合は、30～40重量%の添加量が最適であると考えられる。

15 (実施例7：多段繰り返し反応（メタノール逐次添加）による脂肪酸エステルの製造)

大豆油とメタノールをモル(mol)比で1：1で含有する10gの混合物に、酵素（ノボザイム435）を0.4g加えて、30℃、130振盪/分で振盪しながら1日反応させた。この反応液に1モル当量のメタノールを添加し、
 20 2日目の反応を行なった。2日目の反応終了後、さらに1モル当量のメタノールを添加し、3日目の反応を行なった。この3日間の反応を1サイクルとした。1サイクルの終了後、反応液を全部回収し、大豆油とメタノールをモル(mol)比で1：1で含有する10gの混合物に新たに加えて、2サイクル目の反応を開始した。1サイクル目と同様、3日間のメタノールの逐次添加
 25 反応を行なった。このサイクルを繰り返して、50サイクルの反応を行なった。

3日目の反応終了時の脂肪酸エステル量をGCおよびTLCで分析した。結果を表7に示す。変換率は、基質として使用した油脂のメチルエステルへの変換率を示し、加水分解率は全脂肪酸量に対する遊離脂肪酸の割合で表わした。

5

表 7

10

サイクル数	変換率 (%)	加水分解率 (%)
1	95.0	1.01
5	96.4	1.01
10	99.7	0.49
20	98.5	0.53
30	98.4	0.27
40	97.3	0.36
50	95.9	0.60

15

バッチ形式で50サイクルのメタノールの逐次添加反応でも酵素は失活せず、ほぼ定量的に脂肪酸エステル化が進行した。

20

(実施例8：一部リサイクルによる脂肪酸エステルの連続製造)

50mlの容量のカラムに4gのノボザイム435（容量11ml）を充填し、大豆油62.5g、メタノール7.5gおよびオレイン酸メチル30gの合計100g（125ml）を、流速5.5ml/時でカラムの上部からフィードした。保持時間は、約40分であった。これを1サイクル目とした。

25

溶出液を静置し、その上層（脂肪酸エステル：下層はグリセリン）30gを、大豆油62.5gとメタノール7.5gの混合液に添加し、基質を作成した。この基質を、上記カラムに流速5.5ml/時でフィードした。これを2サイクル目とした。サイクルを繰り返して、100サイクルの反応を行った。結果を表8に示す。

表 8

サイクル数	変換率 (%)	加水分解率 (%)
1	87.5	0.62
10	99.6	1.03
20	99.7	0.87
60	97.3	0.53
100	95.4	0.61

5

10

一部リサイクルにより、基質中に脂肪酸エステルを反応当初から存在させることにより、酵素が失活することなく、脂肪酸エステルが連続的に製造できることが確認された。

(実施例 9 : 2 段階逐次添加法による廃油のメチルエステルへの連続変換)

15

20

実施例 6 に記載のように、30%のメチルエステルの存在下では油 1 モルに対して 3 モルのメタノールを添加しても酵素の失活は認められなかった。そこで、1 段目の反応は、廃油とメタノールとのモル比 1 : 1 の混合物 10 g に固定化酵素 (ノボザイム 435) 0.4 g を加えて、30℃で、130 振盪/分で振盪しながら 12 時間反応させた。反応終了後、2 段目の反応として、基質である廃油に対して 2 モル等量のメタノールを添加し、さらに 24 時間反応を継続した。この 2 段階の反応を 1 サイクルとした。各サイクルの終了後、酵素を回収して、同じ反応を繰り返した。結果を表 9 に示す。

表 9

サイクル数	組成(重量%)				加水分解率 (%)
	メチルエステル	モノグリセリド	ジグリセリド	トリグリセリド	
1	97.1	1.0	1.8	nd	0.20
5	98.4	0.4	1.0	nd	0.15
10	97.7	nd	1.3	0.8	0.24
30	97.1	0.9	1.6	0.2	0.22
50	98.6	0.1	1.2	nd	0.12
75	96.2	1.5	2.3	1.0	0.18
100	95.0	1.7	2.0	1.3	0.11

メチルエステル存在下で反応させることにより、反応系にメタノールをより多く添加することができた。この条件下では、実施例 7 に比べて反応効率を 2 倍に高めることができた。また、100 サイクル目 (150 日間の反応) でも酵素は失活することなく、メチルエステルが 95% 以上の高い収率で得られた。

(実施例 10 : 3 段階カラム法による廃油のメチルエステルへの連続変換)

ノボザイム 435 を 3 g 充填した固定層型カラム (1.5 × 8 cm) を 3 本準備した。廃油とメタノールとをモル比 1 : 1 で混合し、混合液を調製した。得られた混合液を、ペリスタポンプを用いて、6 ml/h r の速度で第 1 番目のカラムに負荷し、カラム溶出液 (反応液) を得た。溶出液を静置後、油層を回収した。この油層に、初発原料の廃油に対して 1 モル等量のメタノールを加えて混合液を得、この混合液を 6 ml/h r の速度で、第 2 番目のカラムに負荷し、カラム溶出液を得た。得られた溶出液を静置後、油層を回収した。この油層に初発原料の廃油に対して 1 モル等量のメタノールを加え、混合液を得た。この混合液を 6 ml/h r の速度で、第 3 番目のカラムに負荷し、カラム溶出液を得た。溶出液を静置後、油層を回収し、メチルエステ

ルを回収した。この3段階カラム法を100日間連続して行なった。結果を表10に示した。

表10

5

日数	トリエステル含量(重量%)			遊離脂肪酸(重量%)*
	第1段階	第2段階	第3段階	
1	30.4	63.7	90.9	0.3
10	33.7	65.7	94.2	0.2
30	33.7	66.2	98.5	0.2
50	33.0	65.4	97.8	0.1
70	33.4	65.9	97.1	0.1
100	33.2	65.5	96.9	0.1

10

* 遊離脂肪酸量は第3段階終了時の値である。

100日間連続運転しても酵素活性の低下はほとんど認められなかった。

15

(実施例11：2段階および3段階のエタノール逐次添加法によるマグロ油のエチルエステル化)

A：2段階反応

マグロ油（平均分子量905）とエタノールとのモル比1：1の混合液10gに0.4gのノボザイム435を加え、40℃で、130振盪/分で振盪しながら12時間反応させ、第1段階の反応とした。第1段階反応の終了後、マグロ油に対して2モル等量のエタノールを添加し、さらに36時間反応を継続し、第2段階の反応を行なった。この2段階の、48時間の反応を1サイクルとした。各サイクルの終了後、酵素を回収して、同じ反応を繰り返した。

25

B：3段階反応

マグロ油とエタノールとのモル比1:1の混合液10gに0.4gのノボザイム435を加え、40℃で、130振盪/分で振盪しながら12時間反応させ、第1段階の反応を行った。第1段階の反応終了後、マグロ油に対して1モル等量のエタノールを添加し、さらに12時間反応を継続して、第2段階の反応とした。第2段階の反応の終了後、マグロ油に対してさらに1モル等量のエタノールを添加し、24時間反応を行ない、第3段階の反応とした。この3段階の、48時間の反応を1サイクルとした。各サイクルの終了後、酵素を回収して、同じ反応を繰り返した。結果を表11に示す。

表 1 1

サイクル数	3段階反応	2段階反応
2	96.3	96.4
4	96.2	96.1
8	97.1	96.8
10	96.0	93.1
12	95.7	95.9
15	95.7	96.2
17	95.3	96.3
19	95.1	94.7
22	93.9	95.1
24	95.5	95.2
26	95.7	93.9
29	95.0	95.8
31	95.0	93.0
33	95.7	92.0
36	95.1	90.3
38	93.1	70.9
40	92.9	65.7
43	95.1	58.7
45	95.6	40.1
47	95.4	32.6
50	95.0	23.8
52	94.0	14.9
54	95.1	7.0

数字は変換率(%)

3段階反応では、50サイクル(100日間)以上を過ぎてもなお、活性

が維持され、マグロ油中の脂肪酸の95%がエチルエステルに変換されたのに対して、2段階反応では、35サイクル以上になると、活性が急速に低下し、50サイクル(100日)後は、油のエチルエステルへの変換率は24%まで低下していた。反応を30℃で行ったときにはこのような現象は見られなかった。この原因は以下の理由によるものと考えられる。すなわち、2段階反応においては、1段目の反応で変換率が30%に達しないうちに2モル等量のエタノールが加えられたことになり、反応系中に存在するエタノール濃度が高くなった結果、酵素の温度による失活とエタノールによる失活とが加わり、急激な変換率の低下となったものと考えられる。反応系中のエタノール量を測定しながら、1段目の反応を制御すると、2段階反応においても100日以上連続使用が可能となる。

産業上の利用可能性

本発明により、従来、無溶媒ないし微溶媒系で、安価なアルコールでは得ることができなかった脂肪酸エステルが、エネルギー消費型ではなく、低コストで、かつ効率よく得られることが見いだされた。油脂として、植物油脂、動物油脂などの天然油脂、これらの廃油を用いることにより、環境に廃棄される廃油のリサイクルが可能になると同時に、環境汚染の少ないバイオディーゼル燃料が提供される。

請求の範囲

1. 無ないし微溶媒系において、直鎖低級アルコールのリパーゼ阻害濃度以下の濃度に該直鎖低級アルコール濃度を調節しつつ、リパーゼと油脂と該直鎖低級アルコールとを反応させる、脂肪酸エステルの製造方法。
5
2. 前記直鎖低級アルコールが、メタノールまたはエタノールである、請求項1に記載の方法。
3. 前記油脂が、植物油脂、動物油脂、魚油、微生物によって生産される油脂、これらの混合油脂、あるいはこれらの廃油である、請求項1または2に記載の方法。
10
4. 無ないし微溶媒系において、脂肪酸エステルを添加して、リパーゼと油脂と直鎖低級アルコールとの反応を行う、脂肪酸エステルの製造方法。
15
5. 前記直鎖低級アルコールの濃度が、リパーゼ阻害濃度またはそれ以上の濃度である、請求項4に記載の方法。
6. 前記直鎖低級アルコールが、メタノールまたはエタノールである、請求項4または5に記載の方法。
20
7. 前記脂肪酸エステルが、反応開始時に反応液の10～80重量%存在する、請求項4ないし6いずれかの項に記載の方法。
25
8. 前記反応が反応生成物のリサイクルにより行われ、供給液中に脂肪酸

エステルが10～80重量%含まれている、請求項7に記載の方法。

9. 前記油脂が、植物油脂、動物油脂、魚油、微生物によって生産される油脂、これらの混合油脂、あるいはこれらの廃油である、請求項4ないし8
5 いずれかの項に記載の方法。

10. 無ないし微溶媒系における脂肪酸エステルの製造方法であって、以下の工程：

10 (1) リパーゼ阻害濃度以下の直鎖低級アルコールと油脂とを反応させる工程：

および

(2) (1) の反応終了液に、さらにリパーゼ阻害濃度またはそれ以上の濃度の直鎖低級アルコールを添加する工程：
を含む、方法。

15

11. さらに、

(3) (2) の反応液の全部または1部を、油脂と直鎖低級アルコールの混合液に添加して、連続的または逐次的に反応させる工程；を含む、請求項10に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12P 7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12P 7/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), WPI (DIALOG), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	HAAS, M. J. et al., "Diesel fuel as a solvent for lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides and phosphatidylcholine", J. Am. Oil Chem. Soc. (1996) Vol. 73, No. 11, p. 1497-1504	<u>1-3</u> 4-11
<u>X</u> A	LECOINTE, C. et al., "Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases", Biotechnol. Lett. (1996) Vol. 18, No. 8, p. 869-874	<u>1-3</u> 4-11
<u>X</u> A	BRIAND, S. et al., "Enzyme fatty esters synthesis in aqueous medium with lipase from Candida parapsilosis (Ashford) Langeron and Talice", Biotechnol. Lett. (1994) Vol. 16, No. 8, p. 813-818	<u>1-3</u> 4-11
<u>X</u> A	JP, 63-192393, A (Unilever Patent Holdings B.V.), 09 August, 1988 (09.08.88) & EP, 274798, A & DK, 8706713, A & US, 4956286, A	<u>1-3</u> 4-11
<u>X</u> A	JP, 60-078587, A (LION CORPORATION), 04 May, 1985 (04.05.85) (Family: none) SHIMADA, Y. et al., "Conversion of vegetable oil to	<u>1-3</u> 4-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 November, 1999 (12.11.99)Date of mailing of the international search report
24 November, 1999 (24.11.99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04392

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SHIMADA, Y. et al., "Conversion of vegetable oil to Biodiesel using immobilized Candida antarctica lipase", J. Am. Oil Chem. Soc. (July, 1999) Vol. 76, No. 7, p. 789-793	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12P 7/64

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12P 7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), WPI (DIALOG), JICST7741 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	HAAS, M. J. et al. "Diesel fuel as a solvent for lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides and phosphatidylcholine", J. Am. Oil Chem. Soc. (1996) Vol. 73, No. 11, p. 1497-1504	1-3 4-11
X A	LECOINTE, C. et al. "Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases", Biotechnol. Lett. (1996) Vol. 18, No. 8, p. 869-874	1-3 4-11
X A	BRIAND, S. et al. "Enzyme fatty esters synthesis in aqueous medium with lipase from Candida parapsilosis (Ashford) Langeron and Talice", Biotechnol. Lett. (1994) Vol. 16, No. 8, p. 813-818	1-3 4-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.11.99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{A}$	JP, 63-192393, A (エリバー・ナームロー・ベンゾトシャープ) 09. 08月. 1988 (09. 08. 88) & EP, 274798, A & DK, 8706713, A & US, 4956286, A	$\frac{1-3}{4-11}$
$\frac{X}{A}$	JP, 60-078587, A (ライオン株式会社) 04. 05月. 1985 (04. 05. 85) (ファミリーなし)	$\frac{1-3}{4-11}$
P, X	SHIMADA, Y. et al. "Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized Candida antarctica lipase", J. Am. Oil Chem. Soc. (1999. Jul.) Vol. 76, No. 7, p. 789-793	1-11